

На правах рукописи

ЛАСТОВКА Анастасия Валерьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ,
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК
КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДНОГО (-)-ИЗОПУЛЕГОЛА – СОЕДИНЕНИЯ
С ВЫСОКОЙ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)

Научный руководитель:

доктор химических наук,
главный научный сотрудник лаборатории микроанализа НИОХ СО РАН
Фадеева Валентина Павловна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор,
главный научный сотрудник аналитической лаборатории
Малахов Владислав Вениаминович
ФГБУН ФИЦ «Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН»
г. Новосибирск

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник лаборатории изотопно-аналитической геохимии
Николаева Ирина Викторовна
ФГБУН Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН
г. Новосибирск

Ведущая организация:

ФГБУН Институт химии твердого тела и механохимии (ИХТТМ) СО РАН
г. Новосибирск

защита состоится «25» марта 2020 г. в 10.00 часов
на заседании диссертационного совета Д 003.051.01
в ФГБУН Институте неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
по адресу: просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
ФГБУН Института неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
и на сайте организации по адресу:

<http://www.niic.nsc.ru/institute/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан «27» января 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физико-математических наук



В.А. Надолинный

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Боль является наиболее распространенным симптомом, причиняющим страдания миллионам людей. Имеющиеся в настоящее время на рынке такие болеутоляющие средства, как ацетилсалициловая кислота, анальгин и диклофенак натрия (по фармакологическому действию являются ненаркотическими анальгетиками), либо недостаточно эффективны, либо обладают серьезными побочными эффектами [1]. Таким образом, актуальной задачей является создание и исследование анальгетиков нового структурного типа, сочетающих высокую эффективность с низкой токсичностью.

В отделе медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН было получено новое производное монотерпеноида (–)-изопулегола – (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ол (**1**) (рис. 1). Соединение сочетает высокую анальгетическую активность в тестах висцеральной боли «уксусные корчи» и «горячая пластинка» и низкую острую токсичность, имеет эффект пролонгированного действия при пероральном введении. Анальгетический эффект при введении соединения мышам в дозе всего 1 мг/кг сохранялся в течение 24 ч [2].

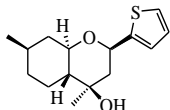


Рис. 1. Структурная формула (**1**) (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола (производное монотерпеноида (–)-изопулегола, производное 2*H*-хромена, фармацевтический агент, физиологически активное вещество)

Совершенно очевидно, что фармацевтические продукты от физиологически активного вещества (ФВ) до готовой лекарственной формы (ГЛФ) должны быть наиболее полно охарактеризованы комплексом физико-химических методов. На начальном этапе – это изучение свойств и доказательство чистоты. Безопасность лекарственного средства (ЛС) зависит не только от фармако-токсикологических свойств, но и от примесей, которые оно содержит. Поэтому аналитическая деятельность, касающаяся определения примесей в фармацевтических продуктах, является одной из наиболее важных проблем современного фармацевтического анализа.

Далее необходимо исследовать взаимодействие анализируемого (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола с живым организмом с получением фармакокинетических и фармакодинамических данных. Для построения фармакокинетического профиля необходимо разработать и валидировать чувствительные и точные биоаналитические методики определения ФВ в плазме крови и цельной крови животных, которые включают этап пробоподготовки – извлечение вещества из биологической матрицы, затем определение высокочувствительным инструментальным методом.

Цель работы. Настоящая работа посвящена исследованию физико-химических свойств физиологически активного вещества (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола, обладающего анальгетической активностью; разработке и валидации комплекса аналитических методик контроля чистоты; разработке и валидации методик определения производного 2*H*-хромена в плазме крови и цельной крови крыс с целью последующего исследования фармакокинетического профиля.

В рамках поставленной цели решали **следующие задачи:**

- исследование физико-химических свойств с получением данных по:
 - ✓ внешнему виду, запаху, цвету;
 - ✓ растворимости в растворителях разной полярности;
 - ✓ цветности, прозрачности и степени мутности растворов **1**;
 - ✓ показателям рН растворов исследуемого соединения;
 - ✓ спектральным характеристикам;
 - ✓ термической устойчивости с применением методов термогравиметрического анализа (**ТГА**) и дифференциальной сканирующей калориметрии (**ДСК**);
 - ✓ структуре, кристаллическая или аморфная по результатам рентгеноструктурного анализа (**РСА**);
- установление состава и строения соединения **1** с применением методов элементного анализа, инфракрасной (**ИК**-) спектроскопии, спектроскопии ¹H- и ¹³C-ядерного магнитного резонанса (**ЯМР**);
- идентификация технологических примесей в анализируемом соединении, разработка и валидация методики определения действующего вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) с УФ-детектированием;
- исследование возможности определения элементных примесей в соединении **1** методом атомно-эмиссионной спектрометрии с микроволновой плазмой (**МП-АЭС**);
- разработка и валидация методики определения остаточных органических растворителей (**ООР**): дихлорметана (**ДХМ**), этилацетата (**ЭА**), метил-*трет*-бутилового эфира (**МТБЭ**), *n*-гексана в исследуемом соединении методом газовой хроматографии (**ГХ**) с пламенно-ионизационным детектированием (**ПИД**);
- разработка стандартного образца предприятия (**СОП**) соединения **1** с получением его метрологических характеристик;
- разработка и валидация биоаналитических методик определения производного 2*H*-хромена в плазме крови и цельной крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (**ВЭЖХ-МС/МС**) с целью изучения фармакокинетического (**ФК**) профиля.

Научная новизна работы

1. Впервые исследованы физико-химические свойства (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола, обладающего анальгетической активностью. Методами элементного и рентгеноструктурного анализа подтвержден состав и пространственное расположение атомов в исследуемом соединении. Определена растворимость в растворителях разной полярности. Соединение **1** можно отнести к легко растворимым в ацетонитриле, ацетоне, хлороформе и метиловом спирте; растворимым в этиловом спирте; практически нерастворимым в воде. Получены термические и спектральные характеристики. Температура плавления вещества равна 143°C, энтальпия плавления составила 123.1 Дж/г. Охарактеризованы цветность, прозрачность, степень мутности и pH растворов соединения **1** в различных растворителях. Проведено исследование производного 2*H*-хромена на присутствие механических включений, сульфатной золы и воды. Разработан качественный способ определения подлинности исследуемого соединения реакцией с изатином в сильнокислой среде.

2. Разработанная ВЭЖХ-УФ методика позволяет идентифицировать технологические примеси и определять содержание действующего вещества в соединении **1**. Специфичность методики доказана отсутствием посторонних пиков при сравнении хроматограмм чистого растворителя и раствора аналита в этом же растворителе. С использованием разработанной методики возможно определение 6 технологических примесей с пределами обнаружения, мкг/мл: 5.6×10^{-2} для тиофен-2-карбальдегида; 3.2×10^{-1} для (-)-изопулегола; 2.2×10^{-1} для стереоизомера; 1.8×10^{-1} , 2.2×10^{-1} и 3.7×10^{-1} для продуктов дегидратации. Пределы обнаружения и количественного определения соединения **1** составили 3.2×10^{-2} и 1.0×10^{-1} мкг/мл, соответственно. Показано, что методика обладает достаточной линейностью, правильностью и прецизионностью в диапазонах малых и больших концентраций ~0.05-1% и ~70-130% от номинального количества соединения **1**. Установлено, что содержания возможных технологических примесей находились ниже найденных пределов обнаружения, а среднее значение процентного содержания действующего вещества было не менее 99.6%. Представленная методика является простой, точной и может быть применена при получении анализируемого соединения для контроля по показателям «технологические примеси» и «действующее вещество».

3. Исследована возможность одновременного определения элементных примесей методом МП-АЭС в соединении **1**. Разработан способ пробоподготовки в микроволновой системе автоклавного растворения. Подобранные условия позволяют определить 15 элементных примесей с пределами обнаружения, ppb: 1.9 для Al, 27 для V, 27 для Fe, 10 для Co, 1.4 для Ni, 2.6 для Cu, 11 для As, 2.1 для Mo, 2.2 для Ru, 4.8 для Pd, 2.0 для Ag, 6.6 для Cd, 37 для Pt, 2.6 для Hg, 5.1 для Pb. Для каждой элемент-

ной примеси установлен рабочий интервал концентраций, в пределах которого определена прецизионность аналитической методики.

4. Разработана и валидирована методика определения четырех остаточных органических растворителей: дихлорметана, этилацетата, метил-*трет*-бутилового эфира и *n*-гексана в соединении **1** методом ГХ-ПИД. Впервые для определения растворителей в фармацевтических продуктах использовали неподвижную фазу (**НФ**) на основе модифицированного поли(1-триметилсилил-1-пропин)а (**ПТМСП**), не применявшуюся ранее для таких целей.

5. Разработаны биоаналитические методики определения соединения **1** в плазме крови и цельной крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС. Проведено сравнение методов экстракции сухого пятна матрицы (англ. Dried Matrix Spots, **DMS**) и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (англ. Fabric Phase Sorptive Extraction, **FPSE**) для извлечения образца из биологических сред. Пределы обнаружения соединения **1** были равны 20 нг/мл для плазма-DMS, 20 нг/мл для кровь-DMS, 20 нг/мл для плазма-FPSE и 50 нг/мл для кровь-FPSE. Средние значения извлечения вещества методом экстракции сухого пятна плазмы крови и цельной крови крыс составили 27 и 25%, соответственно. Средние значения извлечения вещества из плазмы крови и цельной крови с применением метода экстракции на модифицированном целлюлозном носителе были выше и составили 38 и 31%, соответственно. Методики были валидированы, критерии соответствовали требованиям российских и международных регламентирующих документов.

Практическая значимость

На основе выполненного исследования оптимизирован процесс очистки соединения **1**. В общую схему получения вещества **1** введены два дополнительных этапа, которые включают пропускание исходных реагентов через хроматографическую колонку для уменьшения содержания элементных примесей и перекристаллизацию из этилацетата для удаления остатков органических растворителей.

Найдена новая область применения неподвижной фазы на основе модифицированного ПТМСП для определения остаточных органических растворителей в фармацевтических продуктах методом ГХ-ПИД.

Разработанная ВЭЖХ-УФ методика определения действующего вещества и идентификации технологических примесей является простой, быстрой, специфичной, правильной, прецизионной и готова для внедрения при получении субстанции соединения **1**.

Предлагаемая процедура, включающая разложение органического вещества в микроволновой системе автоклавного растворения с последующим анализом на спектрометре с микроволновой плазмой, может быть применена для установления содержания элементных примесей

в нерастворимых в воде физиологически активных соединениях. Таким образом, разработанный комплекс аналитических методик позволяет контролировать содержание примесей различной природы на всех этапах синтеза рассматриваемого вещества.

Изготовлен стандартный образец предприятия, который может быть использован в качестве стандартного вещества для аналитических методик контроля содержания действующего вещества и примесей; получены его метрологические характеристики.

В представленной работе проведено сравнение методов пробоподготовки экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе для извлечения соединения **1** из биологических жидкостей с последующим определением аналита методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложенные и валидированные методики определения анализируемого соединения в плазме крови и цельной крови крыс дают перспективу для исследования фармакокинетического профиля нового физиологически активного вещества аналгетического действия.

Методология и методы диссертационного исследования

Предложенный методологический подход заключается в создании комплекса чувствительных и точных аналитических методик для получения полной информации о свойствах и чистоте физиологически активного соединения (*2R,4R,4aR,7R,8aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола.

Состав и строение соединения **1** определили методами элементного анализа, ИК-спектроскопии, спектроскопии ¹H- и ¹³C-ЯМР. Пространственное расположение атомов установили методом РСА. Термические характеристики были получены с применением методов ТГА и ДСК.

Идентификацию технологических примесей и определение содержания действующего вещества в соединении **1** выполнили методом ВЭЖХ-УФ. Сбор и обработку хроматограмм провели программой МультиХром 2.4. Разработали и валидировали методику определения остаточных органических растворителей методом ГХ-ПИД. Элементные примеси в исследуемом соединении были определены методом МП-АЭС с предварительным разложением органической матрицы в микроволновой системе автоклавного растворения. Управление прибором, сбор первичных экспериментальных данных и построение градуировочных графиков выполнили с применением программного обеспечения MP Expert 1.5.1.6821.

Определение соединения **1** в биологических средах провели методом ВЭЖХ-МС/МС. Извлечение образца выполнили методами экстракции сухого пятна матрицы или экстракции с применением модифицированного целлюлозного носителя. Программное обеспечение Analyst 1.6.2 использовали для управления прибором и сбора первичных данных. С помощью программного обеспечения MultiQuant 2.1 обработали полученные хроматограммы. Далее разработанные методики были валидированы

в соответствии с требованиями международных организаций (Европейское агентство лекарственных средств, англ. European Medicines Agency, **ЕМА**; Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов, англ. Food and Drug Administration, **FDA**).

На защиту выносятся следующие положения:

- новые данные о физико-химических свойствах перспективного физиологически активного соединения анальгетического действия;
- валидированная ВЭЖХ-УФ методика идентификации технологических примесей и определения содержания действующего вещества; данные о содержании действующего вещества и технологических примесей;
- способ пробоподготовки в микроволновой системе автоклавного растворения для перевода определяемых элементных примесей в раствор; условия работы на спектрометре для определения элементных примесей методом МП-АЭС; определение As и Hg на уровнях 3.0 и 11 ppb, соответственно, методом гидридной генерации;
- методика и ее валидация для определения остаточных органических растворителей методом ГХ-ПВД с применением новой неподвижной фазы на основе модифицированного поли(1-триметилсилил-1-пропин)а; данные о содержании органических растворителей в соединении **1**;
- разработка стандартного образца предприятия исследуемого соединения и получение его метрологических характеристик;
- валидированные методики определения физиологически активного соединения анальгетического действия в плазме крови и цельной крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС: условия пробоподготовки, параметры хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования.

Личный вклад автора

Сбор и анализ литературных источников выполнен автором самостоятельно. Вклад соискателя в диссертационную работу заключался в планировании экспериментов; выполнении пробпоотбора и пробоподготовки рассматриваемых образцов; разработке и валидации аналитических методик исследования анализируемого объекта различными физико-химическими методами; обработке и анализе полученных данных. В диссертационную работу вошли результаты экспериментальных исследований, полученные автором лично. Интерпретация результатов, подготовка материалов статей и тезисов проводилась совместно с научным руководителем и соавторами.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на II Всероссийской конференции «Аналитическая Спектроскопия» с международным участием (г. Краснодар, Россия, 2015), X Всероссийской научной конференции с международным участием «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (г. Барнаул, Россия, 2016), II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международ-

ным участием (г. Краснодар, Россия, 2017), Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии» (г. Новосибирск, Россия, 2017), Третьем съезде аналитиков России (г. Москва, Россия, 2017), конкурсе молодых ученых НИОХ СО РАН 2017 года (1 место, стипендия Н.Н. Ворожцова), Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» с международным участием (п. Шерегеш, Россия, 2018), VI Международной научной конференции «New functional materials and high technology» (г. Тиват, Черногория, 2018).

Публикации

По результатам работы опубликованы 4 статьи из них 2 – в российских рецензируемых и 2 – зарубежных рецензируемых журналах, все входят в перечень индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования Web of Science. В материалах всероссийских и зарубежных конференций опубликованы тезисы 8 докладов.

Соответствие специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Диссертационная работа соответствует пункту 2 «Методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др)», пункту 3 «Аналитические приборы», пункту 4 «Методическое обеспечение химического анализа», пункту 6 «Метрологическое обеспечение химического анализа», пункту 7 «Теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии», пункту 8 «Методы маскирования, разделения и концентрирования», пункту 15 «Анализ лекарственных препаратов» паспорта специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Структура и объем работы

Работа состоит из 167 страниц печатного текста, 53 рисунков и 53 таблиц. Работа включает введение, литературный обзор, экспериментальную часть, основные результаты, заключение, выводы и список литературы, который содержит 197 работ российских и зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертационная работа разделена на две главы. Литературный обзор «Разработка и валидация аналитических методик контроля фармацевтических продуктов» состоит из пяти разделов. **В первом разделе** рассмотрены возможные органические примеси, допустимые содержания в зависимости от суточной дозы лекарственного препарата (ЛП) и методы определения примесей в фармацевтических продуктах.

Следующий раздел посвящен определению ООР в ФАВ, фармацевтических субстанциях (ФС) и ЛП. Проведено сравнение методик определения ООР, представленных в фармакопее РФ, с методиками

в международных фармакопеях. Также рассмотрены основные этапы определения ООР методом ГХ, которые включают введение пробы в испаритель, разделение аналитов на НФ и детектирование.

В третьем разделе проведен обзор методов и методик определения элементарных примесей. Выполнено сравнение предельно допустимых содержаний (ПДС) и условий определения в фармакопеи РФ с Европейской и Американской фармакопеями. Так как в фармакопеях приводится недостаточное количество информации, подобраны методы и методики, описанные в литературе. Большинство ФАВ – это нерастворимые в воде твердые вещества, для которых при определении элементарных примесей важным этапом анализа является пробоподготовка. В разделе 1.3 также приведены условия пробоподготовки; требования к чистоте посуды и квалификации реактивов при определении низких содержаний элементарных примесей.

За этапом изучения физико-химических свойств и доказательства чистоты при разработке ФАВ, ФС и ЛП следует исследование фармакокинетического профиля. Для этого требуется разработать чувствительные биоаналитические методики определения анализируемого соединения в биологических средах. **В разделе 1.4** структурированы характерные особенности методов извлечения образцов из плазмы крови и цельной крови животных, хроматографические и масс-спектрометрические условия проведения анализа.

Для доказательства того, что с использованием предложенной методики можно получить достоверные и воспроизводимые результаты, необходимо выполнить валидационные испытания. **Последний раздел** литературного обзора включает рассмотрение критериев валидационных тестов для спектрометрических и хроматографических методик.

Экспериментальная часть «Исследование физико-химических свойств, разработка и валидация аналитических методик контроля (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола» состоит из семи разделов.

Исследование физико-химических свойств физиологически активного вещества (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола

По внешнему виду образец исследуемого соединения **1** представляет собой желтовато-белую смесь крупнокристаллического и кристаллического порошков без характерного запаха. ФАВ по показателю «растворимость», можно отнести к легко растворимым в ацетонитриле, ацетоне, хлороформе и метиловом спирте; растворимым в этиловом спирте; практически нерастворимым в воде.

В УФ-спектре, записанном на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США), для метанольного раствора соединения **1**

в области от 800 до 200 нм присутствовал один максимум при длине волны 234 нм. Коэффициент экстинкции $\sim 10^4 \text{ л} \times \text{см}^{-1} \times \text{моль}^{-1}$.

Температура плавления была измерена на термосистеме FP900 (Mettler Toledo, Швейцария) со скоростью нагрева 1 и 5°C/мин. Термическое разложение проводили на синхронном термическом анализаторе STA 409 PC Luxx (Netzsch, Германия). Значения температуры плавления соединения **1** при скоростях нагрева 1 и 5°C/мин, определенные на термосистеме FP900, составили 141.8 – 142.1 и 141.7°C, соответственно. При термоан-

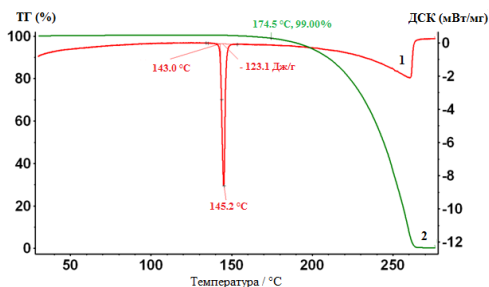


Рис. 2. Термические кривые вещества **1**: ДСК (1), ТГ (2)

литическом исследовании в токе гелия со скоростью нагрева 10°C/мин температура плавления вещества **1** была равна 143.0°C. Энтальпия плавления составила 123.1 Дж/г. Температура начала разложения вещества соответствовала температуре 174.5°C на кривой ТГ, а температура конца разложения была равна 263.0°C (рис. 2).

Состав и строение синтезированного соединения (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола доказаны данными элементного анализа, ИК-, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, РСА.

Элементный анализ выполняли на автоматическом CHNS/O-элементном анализаторе EuroVector EA-3000 (HEKAtech GmbH, Германия). Кроме того, содержание углерода и водорода определяли гравиметрическим методом ускоренного сжигания, а содержание серы титриметрически после сжигания вещества в колбе, заполненной кислородом. При этом найдено содержание, в %: углерода – 67.5, водорода – 8.2, кислорода – 12.0, серы – 11.9. Вычислено содержание, в %: углерода – 67.6, водорода – 8.3, кислорода – 12.0, серы – 12.0.

Определение молекулярной массы проводили на масс-спектрометре высокого разрешения DFS (Thermo Electron, Германия) в режиме полного сканирования (15-500 m/z , 70 эВ, прямое введение образца). Результаты масс-спектрометрического анализа: 266.1332 а. е. м. (M^+ , $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}^+$; вычислено 266.1335 а. е. м.).

ИК-спектры получали на ИК-Фурье спектрометре Varian 640IR (Varian Inc., США) в таблетках KBr (1:150, вещество:KBr), 4000-400 см^{-1} .

Интенсивная полоса поглощения с четко выраженным максимумом при 3496 см^{-1} на ИК-спектре (рис. 3) исследуемого соединения обусловлена валентными колебаниями ОН-группы. К другим колебаниям, которые характерны для третичных спиртов, относятся деформационные колебания СОН-группы при 1315 см^{-1} и валентные колебания СО при 1184 см^{-1} .

Можно выделить ряд характеристических полос, соответствующих 2-монозамещенному кольцу тиофена: 1238 cm^{-1} – плоскостные деформационные колебания СН, 1120 и 1030 cm^{-1} – деформационные колебания связи СН, 914, 852 и 839 cm^{-1} – внеплоскостные деформационные колебания СН, 688 cm^{-1} – наиболее интенсивная полоса поглощения, деформационные колебания тиофенового кольца. 1099 cm^{-1} антисимметричные валентные колебания СОС-группы, 802 cm^{-1} симметричные валентные колебания СОС-группы. Интенсивная полоса поглощения при 2945 cm^{-1} характерна для антисимметричных валентных колебаний $-\text{CH}_3$ групп, 2856 cm^{-1} – симметричные валентные колебания $-\text{CH}_3$ групп, 1444 cm^{-1} – антисимметричные деформационные колебания $-\text{CH}_3$ групп или деформационные колебания $-\text{CH}_2$ -групп в циклических алканах, 1387 cm^{-1} – симметричные деформационные колебания $-\text{CH}_3$ групп. ИК-спектр ФАВ получен и расшифрован впервые и далее может быть использован для идентификации данного соединения.

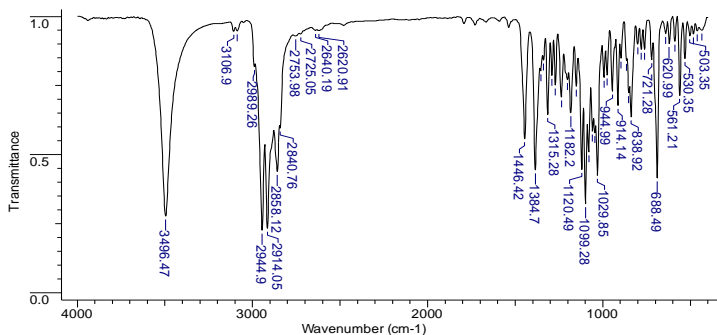


Рис. 3. ИК-спектр соединения **1** (ось X – длина волны, cm^{-1} ; ось Y – пропускание)

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР были записаны на спектрометре AVANCE III 400 (Bruker Corporation, Германия) в растворе CDCl_3 с использованием стандартных методик. Полученные ЯМР-спектры соединения **1** соответствовали спектрам, ранее опубликованным в литературе [1,2].

Разработка и валидация аналитических методик контроля чистоты физиологически активного соединения (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола

Аналитический контроль производного (-)-изопулегола по показателям «технологические примеси» и «действующее вещество»

Идентификацию технологических примесей и определение содержания действующего вещества в перспективном ФАВ (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-оле выполняли методом ВЭЖХ-УФ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск) с УФ-детектором (190-360 нм), про-

граммное обеспечение – пакет «МультиХром 1.5х-Е» (ЗАО «Амперсэнд», г. Новосибирск).

В результате синтеза и выделения в соединении могут присутствовать технологические примеси, среди которых исходные реагенты – тиофен-2-карбальдегид и (–)-изопулегол, родственная примесь – стереоизомер ФАВ, промежуточные соединения – продукты дегидратации. Разработанные хроматографические условия позволили разделить возможные технологические примеси и анализируемое соединение **1** с требуемым разрешением, не менее 1.5 (рис. 4). Содержания тиофен-2-карбальдегида, (–)-изопулегола, стереоизомера и продуктов дегидратации находились ниже установленных пределов обнаружения: 5.6×10^{-2} , 3.2×10^{-1} , 2.2×10^{-1} , 1.8×10^{-1} , 2.2×10^{-1} , 3.7×10^{-1} мкг/мл, соответственно (рис. 5). Процентное содержание действующего вещества в соединении **1** составило не менее 99.6%.

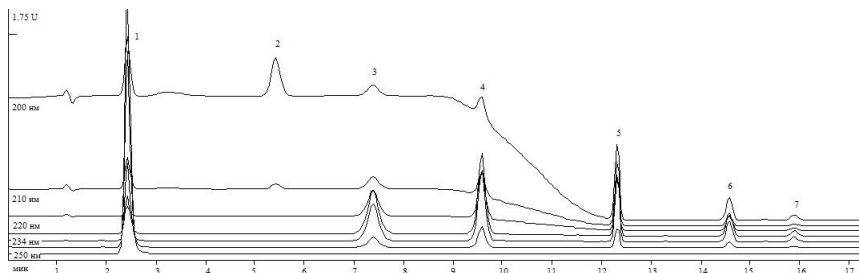


Рис. 4. Хроматограмма раствора модельной смеси: тиофен-2-карбальдегид (пик № 1), (–)-изопулегол (пик № 2), соединение **1** (пик № 3), стереоизомер **1** (пик № 4), продукты дегидратации (пик № 5, 6, 7)

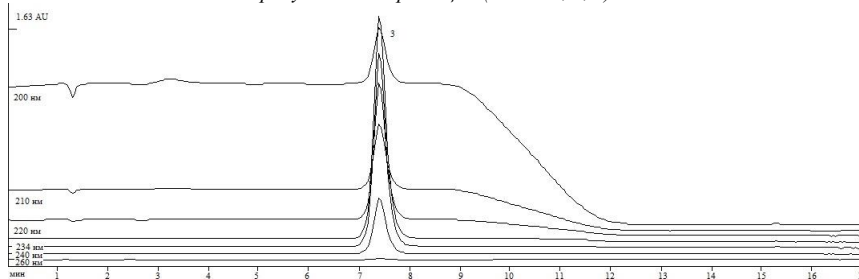


Рис. 5. Хроматограмма испытуемого раствора с концентрацией 1.0 мг/мл

Проведена валидация методики определения содержания действующего вещества по следующим характеристикам: специфичность, предел обнаружения (ПО), предел количественного определения (ПКО), аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность на уровнях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности, надежность хроматографической системы (табл. 1).

Валидация методики определения действующего вещества

Диапазон концентраций	
~0.050-1.0% от номинального	~70-130% от номинального
Линейность градуировочных графиков	
Коэффициент корреляции – 0.9951	Коэффициент корреляции – 0.9981
Прецизионность на уровне повторяемости (n=5, P=0.95)	
0.50-3.6 мкг/мл – *RSD ≤ 0.9%	0.70-0.90 мг/мл – RSD ≤ 0.5%
3.61-6.6 мкг/мл – RSD ≤ 0.8%	0.91-1.1 мг/мл – RSD ≤ 1.1%
6.61-9.6 мкг/мл – RSD ≤ 0.7%	1.11-1.3 мг/мл – RSD ≤ 1.3%
Критерий: RSD ≤ 2.0%	
Внутрилабораторная прецизионность (n=5, P=0.95)	
0.50-3.6 мкг/мл – RSD ≤ 1.0%	0.70-0.90 мг/мл – RSD ≤ 0.8%
3.61-6.6 мкг/мл – RSD ≤ 0.8%	0.91-1.1 мг/мл – RSD ≤ 1.1%
6.61-9.6 мкг/мл – RSD ≤ 0.6%	1.11-1.3 мг/мл – RSD ≤ 1.9%
Критерий: RSD ≤ 3.0%	
Правильность (метод «введено-найдено», n=5, P=0.95)	
2.20 мкг/мл (99.6±0.6)% RSD=0.5%	0.688 мг/мл (100.2±0.6)% RSD=0.5%
2.45 мкг/мл (100.1±1.1)% RSD=0.9%	0.856 мг/мл (99.5±0.5)% RSD=0.4%
4.05 мкг/мл (99.8±0.9)% RSD=0.8%	1.03 мг/мл (99.7±1.4)% RSD=1.1%
4.40 мкг/мл (99.6±0.6)% RSD=0.5%	1.05 мг/мл (100.6±0.8)% RSD=0.7%
7.10 мкг/мл (99.8±0.8)% RSD=0.6%	1.19 мг/мл (100.1±1.7)% RSD=1.3%
7.10 мкг/мл (99.8±0.9)% RSD=0.7%	1.23 мг/мл (99.3±1.1)% RSD=0.9%
Критерий: (100±2)%	

Примечание: *RSD – относительное стандартное отклонение

Хроматографическая методика является специфичной, надежной, точной и достоверной для идентификации технологических примесей и определения действующего вещества в соединении **1**.

Определение чистоты физиологически активного вещества (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола по показателю «остаточные органические растворители»

Исследуемое ФАВ **1** получали реакцией тиофен-2-карбальдегида и (–)-изопулегола в присутствии катализатора монтмориллонита K10 с использованием ДХМ в качестве растворителя. Затем ДХМ отгоняли на ротационном испарителе, реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, добавляли ЭА, катализатор отфильтровывали, растворитель отгоняли. Остаток растворяли в МТБЭ с последующим добавлением *n*-гексана и оставляли при комнатной температуре для кристаллизации. Процедуру перекристаллизации повторяли несколько раз [1,2]. Таким образом, при получении соединения **1** применяли четыре растворителя: ДХМ, ЭА, МТБЭ, *n*-гексан.

Каждый ООР имеет свой класс токсичности и ПДС в фармацевтических продуктах. Растворители *n*-гексан и ДХМ относятся ко второму классу токсичности. ПДС для *n*-гексана и ДХМ, согласно ГФ XIII, составляют 290 и 600 ppm, соответственно. Растворитель ЭА в ГФ XIII не отнесен

к какому-либо классу токсичности. В ГФ XII, так же как в основных фармакопеях мира, ЭА относят к группе растворителей третьего класса токсичности, для которых установлено ПДС на уровне 0.5%. К этому же классу токсичности относится МТБЭ. Эти значения ПДС были приняты как заданные.

Определение растворителей выполняли методом ГХ на газовых хроматографах Agilent 6890 (Agilent Technologies, США) и Кристалл 2000 (Хроматэк, Россия) с ПИД, разделение компонентов смеси проводили на коммерческих и некоммерческих капиллярных колонках разной полярности. В международных фармакопеях предлагают использовать для определения ООР НФ низкой/средней полярности состава 6%-цианопропилфенил-94%-диметилполисилоксан под торговыми номерами 624 или 1301 (USP G43). Для решения поставленной задачи также применяли стандартную коммерческую колонку с НФ состава 5%-фенил-95%-диметилполисилоксан под торговым номером 5 (USP G27), которая позволяет решать широкий спектр газохроматографических задач. Кроме вышеперечисленных колонок, использовали некоммерческую колонку, заполненную модифицированным ПТМСП, которая ранее для задач фармацевтического анализа не была опробована.

Методика, включающая парофазный анализ и разделение аналитов на стандартной колонке HP-5MS, позволила определить содержания только двух растворителей – *n*-гексана и ЭА. Использованный растворитель ДМСО для соединения **1**, несмотря на проведенную очистку, содержал легкие примеси, пики которых мешали определению основных компонентов смеси. Времена удерживания посторонних примесных соединений совпадали с времена удерживания ДХМ и МТБЭ. С применением методики, сочетающей прямой ввод раствора образца (ДМСО использовали в качестве основного растворителя исследуемого соединения) в испаритель и разделение определяемых компонентов на коммерческой капиллярной колонке DB-624, удалось идентифицировать и определить требуемые ООР. Также разработана и валидирована методика прямого ввода анализируемого раствора и разделение на некоммерческой капиллярной колонке, заполненной НФ на основе модифицированного ПТМСП.

Из всех возможных ООР была приготовлена модельная смесь и проанализирована в разработанных газохроматографических условиях (рис. 6).

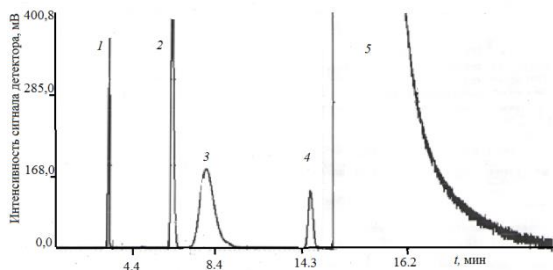


Рис. 6. Хроматограмма модельной смеси растворителей, полученная при разделении на колонке с фазой на основе модифицированного поли(1-триметилсилил-1-пропил)а при температуре колонки 100°C:

1. дихлорметан (3.05 мин);
2. этилацетат (6.53 мин);
3. метил-трет-бутиловый эфир (8.42 мин);
4. *n*-гексан (14.33 мин);
5. диметилсульфоксид (16.23 мин)

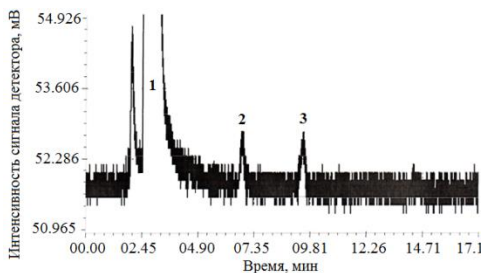


Рис. 7. Хроматограмма соединения **1** в ацетоне:
1 – ацетон; 2 – этилацетат;
3 – метил-трет-бутиловый эфир

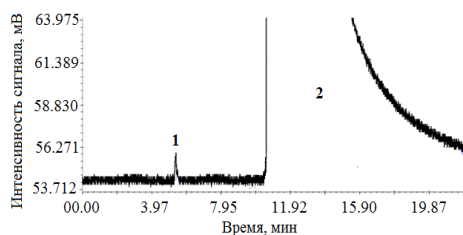


Рис. 8. Хроматограмма соединения **1** в диметилсульфоксиде: 1 – этилацетат; 2 – диметилсульфоксид

В результате проведенных экспериментов в ФАВ найдены следовые содержания ЭА и МТБЭ, 0.10 ± 0.09 ppm ($n=9$, $P=0.95$) и 0.20 ± 0.06 ppm ($n=9$, $P=0.95$), соответственно, значения содержаний ДХМ и *n*-гексана находились ниже установленных ПО (рис. 7,8).

Проведена валидация АМ определения ООР по следующим характеристикам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность, надежность хроматографической системы. Средние значения открываемости находились в интервале от 99.4 до 101% для ЭА и от 99.5 до 100% для МТБЭ. При сравнении результатов, полученных в разные дни, различия в воспроизводимостях отсутствовали, т.е. случайные погрешности были одного порядка.

Проведенные валидационные тесты показывают, что разработанная методика является специфичной, точной и достоверной для определения ООР в анализируемом физиологически активном веществе.

Разработка методики определения элементных примесей

К источникам попадания элементных примесей в анализируемое соединение можно отнести исходное сырье, применяемые в синтезе катализаторы, элементы аппаратуры, а также воздух окружающей среды. Контролировать содержание примесей данной группы необходимо по двум показателям: «сульфатная зола» и количественное определение каждой элементной примеси отдельно.

Сульфатная зола в фармацевтических продуктах не должна превышать 0.1%. Методика определения сульфатной золы является стандартной и описана в фармакопее РФ. Экспериментальное значение золы в образце, полученном при реализации разработанной технологии, превысило норму в четыре раза. С целью определения причины завышенного результата, провели исследование чистоты реагентов – тиофен-2-карбальдегида и (–)-изопулегола. Средние значения сульфатной золы в анализируемом

соединении и тиофен-2-карбальдегиде совпали и составили 0.4%. Провели очистку альдегида методом колоночной хроматографии и использовали очищенный реагент в синтезе соединения **1**. Далее определили содержания сульфатной золы в заново синтезированном продукте, значение не превысило предельно допустимой нормы 0.1%.

Далее была исследована возможность определения элементных примесей в анализируемом соединении методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой на спектрометре 4100 (Agilent Technologies, Австралия) с программным обеспечением MP Expert 1.5.1.6821 (Agilent Technologies, Австралия), предварительно разложив органическую матрицу в микроволновой системе автоклавного растворения (Milestone ethos one, Италия).

Определение элементных примесей выполняли на МП-АЭС 4100, для определения Hg и As применяли установку для гидридной генерации. Для каждого элемента оптимизированы инструментальные параметры. Длину волны выбирали так, чтобы интенсивность линии аналита была максимальной при минимальных спектральных помехах от других элементов.

На установке для гидридной генерации можно работать в трех режимах: без гидридной генерации, с гидридной генерацией и подачей образца через один канал, с гидридной генерацией и подачей образца через два канала. С целью увеличения чувствительности для Hg, As и экономии анализируемых растворов нами был выбран второй режим с гидридной генерацией и подачей образца через один канал.

Состав боргидрида натрия подбирали экспериментально. Из литературных источников известно, что для гидридной генерации As применяют 0.3% раствор NaBH_4 , стабилизированный 0.5% раствором NaOH. As имеет три длины волны 188.979, 193.695 и 234.984 нм с максимальной интенсивностью, для определения As использовали $\lambda=188.979$ нм. При воспроизведении предложенных условий были получены спектры плохого качества (рис. 9). Далее были исследованы растворы боргидрида натрия следующего состава: 0.3% NaBH_4 + 0.5% NaOH, 0.4% NaBH_4 + 0.5% NaOH, 0.5% NaBH_4 + 0.5% NaOH (рис. 10). Удовлетворительного результата удалось добиться с применением 0.4% NaBH_4 , стабилизированного 0.5% NaOH, $\lambda=193.695$ нм и оптимизации давления в распылителе. Следует подчеркнуть, что длина волны менее 200 нм требует длительной продувки монохроматора.

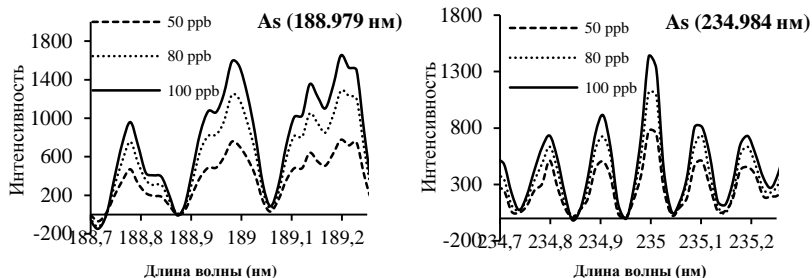


Рис. 9. Спектры растворов As при разных концентрациях и длинах волн. Для гидридной генерации использовали 0.3% раствор NaBH_4 , стабилизированный 0.5% раствором NaOH

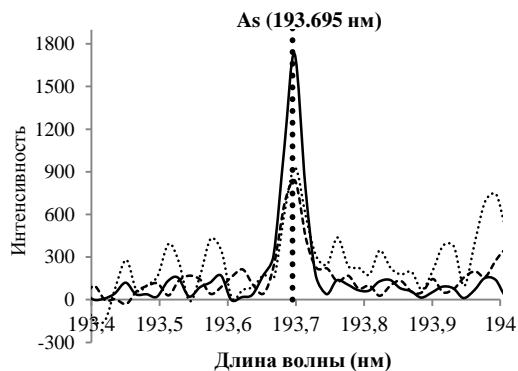


Рис. 10. Спектры растворов As при разных концентрациях, $\lambda=193.695$ нм.

Для гидридной генерации использовали разные составы NaBH_4 , стабилизированного раствором NaOH :

- 80 ppb,
0.4% NaBH_4 +0.5% NaOH ;
- 100 ppb,
0.3% NaBH_4 +0.5% NaOH ;
- 100 ppb,
0.5% NaBH_4 +0.5% NaOH

Ртуть относится к тем элементам, для которых выбор параметров работы на спектрометре является важным аспектом для получения интенсивных спектров и линейных градуировочных графиков. Подобранные инструментальные параметры работы на спектрометре для всех анализов: времена чтения (с), забора (с) и стабилизации (с), количество репликаций и скорость насоса представлены в табл. 2. Спектры ртути I имели меньшее значение соотношения сигнал/шум в отличие от спектров ртути II (рис. 11). Гидридную генерацию выполняли, применяя 1.5% раствор NaBH_4 , стабилизированный 0.2% раствором NaOH . Срок хранения раствора боргидрида натрия не более суток.

Инструментальные параметры работы на спектрометре

Элементы	Al	V	Fe	Co	Ni	Cu	As	Sr
$^1\lambda$, нм	396.152	309.311	371.993	340.512	352.454	324.754	193.695	421.552
2t чтения, с	3	3	3	3	3	3	3	3
t забора, с	15	15	15	15	15	15	20	15
t стабил., с	15	15	15	15	15	15	15	15
n	3	3	3	3	3	3	3	3
3V насоса, об/мин	15	15	15	15	15	15	15	15
Элементы	Mo	Ru	Pd	Ag	Cd	Pt	Hg	Pb
λ , нм	379.825	372.803	340.458	328.068	228.802	299.796	253.652	405.781
t чтения, с	3	3	3	3	3	3	10	3
t забора, с	15	15	15	15	15	15	30	15
t стабил., с	15	15	15	15	15	15	20	15
n	3	3	3	3	3	3	10	3
V насоса, об/мин	15	15	15	15	15	15	15	15

Примечание: $^1\lambda$ – длина волны; 2t – время; 3V – скорость

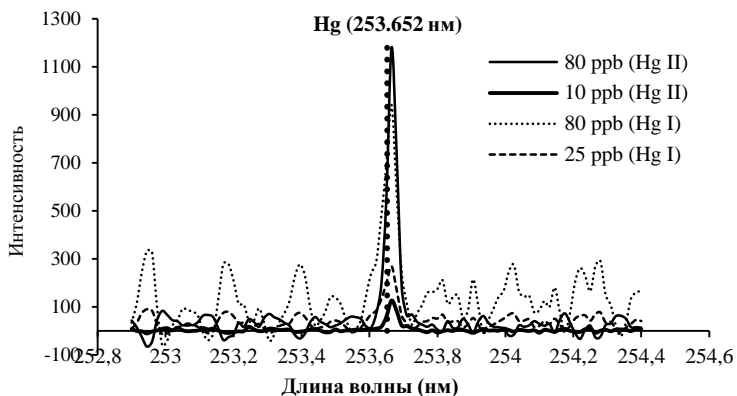


Рис. 11. Спектры растворов Hg I и II при разных концентрациях, $\lambda=253.652$ нм.
Для гибридной генерации использовали 1.5% NaBH₄,
стабилизированный раствором 0.2% NaOH

Разработан способ определения содержания элементных примесей в ФАВ методом МП-АЭС. Оптимизированы рабочие характеристики спектрометра модели 4100. Установлены ПО, ПКО и рабочие диапазоны концентраций для каждого элемента. Рабочие диапазоны концентраций находились в интервале от 20 до 1188 ppb для Al, от 210 до 700 ppb для V, от 51 до 810 ppb для Fe, от 30 до 1000 ppb для Co, от 16 до 117 ppb для Ni, от 12 до 147 ppb для Cu, от 50 до 300 ppb для As, от 20 до 998 ppb для Mo, от 16 до 999 ppb для Ru, от 64 до 1000 ppb для Pd, от 10 до 1002 ppb для Ag, от 20 до 1000 ppb для Cd, от 210 до 2080 ppb для Pt, от 10 до 81 ppb для Hg, от 29 до 450 ppb для Pb.

Содержания V (ПО=27 ppb), Co (ПО=10 ppb), As (ПО=11 ppb), Mo (ПО=2.1 ppb), Ru (ПО=2.2 ppb), Pd (ПО=4.8 ppb), Ag (ПО=2.0 ppb), Cd (ПО=6.6 ppb), Pt (ПО=37 ppb) и Hg (2.6 ppb) находились ниже экспериментально установленных ПО. Найдены содержания Al $(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-4}\%$, Fe $(4.3 \pm 0.9) \times 10^{-4}\%$, Cu $(0.8 \pm 0.6) \times 10^{-4}\%$, Pb $(5.8 \pm 1.5) \times 10^{-5}\%$ с применением метода «введено-найдено» и Al $(1.6 \pm 0.5) \times 10^{-4}\%$, Fe $(3.9 \pm 0.5) \times 10^{-4}\%$, Ni $(3.2 \pm 0.7) \times 10^{-5}\%$, Pb $(2.6 \pm 0.9) \times 10^{-5}\%$ с применением метода «введено-найдено» в сочетании с методом внутреннего стандарта.

Разработка и валидация методик определения (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в плазме крови и цельной крови крыс с применением методов экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС анализом

Одним из этапов на пути к получению фармакокинетических данных является разработка и валидация АМ определения соединения **1** в различных биологических средах методом ВЭЖХ-МС/МС. Предварительно требуется разработка условий пробоподготовки для извлечения анализируемого вещества из плазмы крови и цельной крови животных (рис. 12).

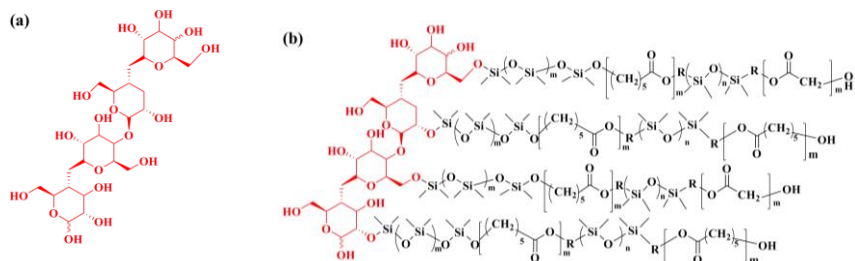


Рис. 12. Химическая структура бумаги для метода экстракции сухого пятна матрицы (а) и экстракции с применением модифицированного целлюлозного носителя (б)

Определение соединения **1** проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-20AD Prominence с термостатируемым автоэмплером при $+10^\circ\text{C}$ (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометре 3200 QTRAP с электроспреей ионизацией (AB Sciex, США).

Разделение соединения **1** и внутреннего стандарта выполняли на термостатируемой колонке ProntoSil-120-5-C18 AQ (2.0×75 мм, 5.0 мкм частицы) («ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия) при $+35^\circ\text{C}$. Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1% раствора муравьиной кислоты в метаноле (элюент Б). Соединения элюировали в градиентном режиме: 0 мин – 3% (Б); 0.5 мин – 3% (Б); 4 мин – 95% (Б); 6.5 мин – 100% (Б); 9 мин – 100% (Б); 9.1 мин – 3% (Б); 12 мин – 3% (Б). Скорость подвижной фазы была равна 200 мкл/мин.

Масс-спектрометрическое детектирование велось в области положительных ионов в режиме MRM (англ. Multiple Reaction Monitoring). Для аналита и внутреннего стандарта оптимизированы параметры работы масс-спектрометра: IS=5500 В, TEM=+400°C, CUR, GS1, GS2=30 psi, CAD=средний, dwell time=80 мсек. Потенциалы ионизации, энергии диссоциации молекул, MRM-переходы и другие параметры соединений представлены в таблице 3. Запись хроматограмм проводилась с применением программного обеспечения Analyst 1.6.2 (AB SCIEX, США), обработка данных выполнялась с использованием программного обеспечения MultiQuant 2.1 (AB SCIEX, США).

Т а б л и ц а 3

Параметры соединения 1 и внутреннего стандарта

Основной ион (m/z)	Фрагментный ион (m/z)	¹ DP (В)	² CE (В)	³ EP (В)	⁴ CXP
Соединение 1 (284.5)	137.2 (количественный)	16	21	3.5	4
	157.4 (качественный)	16	19	3.5	4
Внутренний стандарт (152.3)	93.1 (количественный)	41	33	7.5	4
	107.2 (качественный)	46	33	6.5	4

Примечание: ¹DP – потенциал разрушения; ²CE – энергия соударений; ³EP – входной потенциал; ⁴CXP – напряжение на выходе ячейки соударений

Разработанные методики были валидированы в соответствии с параметрами: специфичность, ПО и ПКО, линейность, правильность, прецизионность, стабильность растворов, перенос и извлечение аналита из матрицы.

С целью подтверждения специфичности методики сравнивали хроматограммы холостого образца плазмы крови или цельной крови с образцом плазмы крови или цельной крови с концентрацией аналита 20 нг/мл (на уровне ПКО) после обработки методом экстракции сухого пятна матрицы. Время удерживания соединения 1 составило 7.28 мин. На хроматограммах холостого и испытуемого образцов присутствовал пик вещества со временем удерживания 7.48 мин. Следует подчеркнуть, что посторонний пик наблюдался на количественном MRM-переходе, поэтому m/z 284.5→157.4 (качественный MRM-переход) может быть использован для определения аналита. Кроме этого, разрешение между пиком аналита и со-экстрагирующимся веществом было более 1.5 (критерий разделения пиков на уровне базовой линии) (рис. 13). Хроматограммы образцов плазмы крови или цельной крови с концентрацией аналита 20 и 50 нг/мл (на уровне ПКО), соответственно, после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе не содержали посторонних пиков (рис. 14).

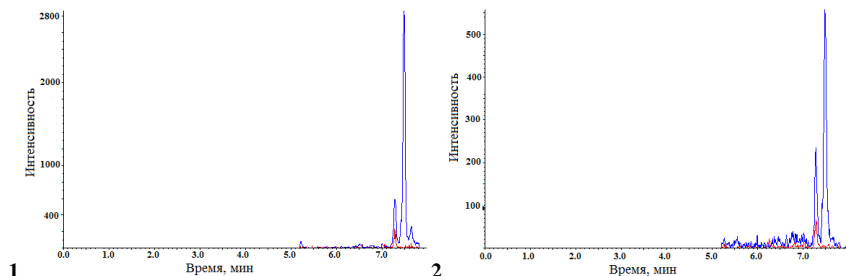


Рис. 13. Хроматограммы образцов плазмы крови (1) и цельной крови (2) с концентрацией соединения **1** 20 нг/мл после обработки методом экстракции сухого пятна матрицы (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

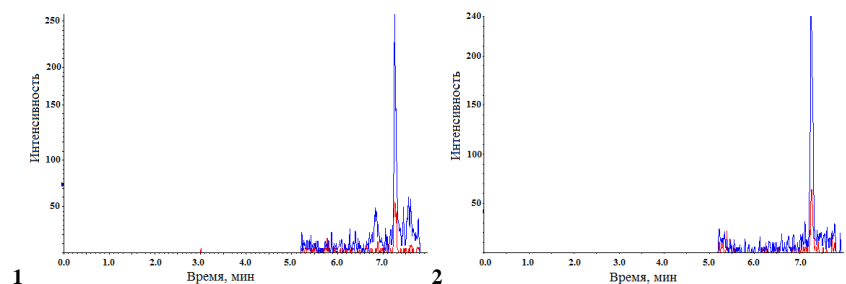


Рис. 14. Хроматограммы образцов плазмы крови (1) и цельной крови (2) с концентрацией **20** и **50** нг/мл, соответственно, после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

Было показано, что графики линейны в диапазоне концентраций от 20 до 5000 нг/мл в DMS, плазма-FPSE экспериментах и в интервале от 50 до 5000 нг/мл в кровь-FPSE эксперименте. Наклон, свободный член уравнения и значение коэффициента корреляции для градуировочного графика в каждом из вариантов определения представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4

Параметры градуировочных графиков

Методика	¹ a	² b	³ r
DPS	1.87×10^{-5}	3.22×10^{-5}	0.991
DBS	4.18×10^{-6}	1.33×10^{-5}	0.998
плазма-FPSE	1.27×10^{-5}	7.28×10^{-5}	0.998
кровь-FPSE	5.17×10^{-6}	5.71×10^{-5}	0.992

Примечание: ¹a – свободный член уравнения; ²b – наклон; ³r – коэффициент корреляции

При оценке прецизионности в течение нескольких дней, значения CV для метода DPS было не более 11%, для DBS ≤ 12%, для плазма-FPSE ≤ 12%, для кровь-FPSE ≤ 13%. Определение прецизионности между днями показало, что значения CV не превышало для метода DPS 9.0%, для DBS – 11%, для плазма-FPSE – 10%, для кровь-FPSE – 10%. Таким образом,

ни одно значение CV не превысило допустимой нормы 15%. Правильность методики в течение дня и между днями для DPS метода находилась в интервале от 95 до 106% и от 98 до 104%, для DBS – от 98 до 102% и от 100 до 101%, для плазма-FPSE от 97 до 101% и от 99 до 100%, для кровь-FPSE от 96 до 103% и от 97 до 102%, соответственно. Значения правильности на уровнях НПКО и нижнего, среднего, верхнего диапазонов концентраций не выходили за пределы интервала $100 \pm 20\%$ и $100 \pm 15\%$, соответственно, для всех способов пробоподготовки.

Экстракционное извлечение соединения **1** из биологических жидкостей в эксперименте прямого нанесения анализируемых образцов на DMS-карточки варьировалось от 23.8 до 28.6%. С целью сравнения данного параметра, FPSE-ткань использовали вместо DMS-карточек при прямом нанесении спайк-растворов исследуемого соединения в условиях одинакового механизма экстракции. Можно отметить, что при применении FPSE-ткани в DMS-эксперименте среднее извлечение изменялось от 29.1 до 45.9% (табл. 5).

Т а б л и ц а 5

**Экстракционное извлечение соединения 1
при использовании DMS-карточек и FPSE-ткани в условиях DMS эксперимента**

		¹ DPS	² DBS	*Плазма- ³ FPSE	*Кровь-FPSE
		Извлечение (среднее значение \pm ⁴ SD,%)			
Соединение 1	Нижний	24.3 \pm 3.1	23.8 \pm 2.0	29.1 \pm 3.1	31.7 \pm 2.7
	Верхний	28.6 \pm 2.5	26.4 \pm 2.3	45.9 \pm 3.9	39.4 \pm 4.4
⁵ n		6	6	6	6

Примечание: ¹DPS – метод экстракции сухого пятна плазмы крови; ²DBS – метод экстракции сухого пятна крови; ³FPSE – метод экстракции на модифицированном целлюлозном носителе; ⁴SD – стандартное отклонение; ⁵n – количество определений; *методика не валидирована

Экстракционное извлечение соединения **1** из плазмы крови и цельной крови животных при помещении FPSE-ткани в спайк разбавленный физраствором (в соответствии с протоколом пробоподготовки) изменялось от 27.0 до 42.1%. Значение извлечения при использовании DMS-карточек в FPSE-эксперименте находилось в интервале от 26.1 до 33.8% (табл. 6).

Т а б л и ц а 6

**Экстракционное извлечение соединения 1
при использовании DMS-карточек и FPSE-ткани в условиях FPSE эксперимента**

		* ¹ DPS	* ² DBS	Плазма- ³ FPSE	Кровь-FPSE
		Извлечение (среднее значение \pm ⁴ SD,%)			
Соединение 1	Нижний	26.1 \pm 2.4	23.7 \pm 2.9	34.6 \pm 3.7	27.0 \pm 3.9
	Верхний	33.8 \pm 1.1	29.1 \pm 2.0	42.1 \pm 2.4	35.7 \pm 3.0
⁵ n		6	6	6	6

Примечание: ¹DPS – метод экстракции сухого пятна плазмы крови; ²DBS – метод экстракции сухого пятна крови; ³FPSE – метод экстракции на модифицированном целлюлозном носителе; ⁴SD – стандартное отклонение; ⁵n – количество определений; *методика не валидирована

Не всегда анализ удается провести в день измерения аналитического сигнала, поэтому требуется установить стабильность анализируемых растворов. Образцы после всех этапов пробоподготовки хранили при $+10^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. После хранения растворы анализировали. В течение заданного времени растворы оставались стабильными.

В результате проделанной работы, разработаны и валидированы методики определения соединения **1** в плазме крови и цельной крови животных с применением для обработки образцов методов экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС анализом. Разработанные методики могут быть использованы для дальнейших фармакокинетических исследований.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Методами элементного анализа, УФ-, ИК-, ЯМР ^1H - и ^{13}C -спектроскопии доказаны состав и строение анализируемого соединения. Методом РСА подтверждено пространственное расположение атомов в соединении. Установлена растворимость в растворителях разной полярности. Получены термические и спектральные характеристики.

2. Разработана и валидирована методика идентификации органических примесей и определения содержания действующего вещества методом ВЭЖХ-УФ. Установлено, что содержания возможных органических примесей находятся ниже найденных пределов обнаружения, а среднее значение содержания действующего вещества не менее 99.6%. При оценке правильности открываемость имеет значения $99.6\pm 0.6\%$ для нижнего диапазона концентраций, $99.8\pm 0.9\%$ для среднего диапазона концентраций, $99.8\pm 0.8\%$ для верхнего диапазона концентраций. Относительное стандартное отклонение составляет 0.7% при оценке повторяемости и 0.8% при оценке внутрилабораторной прецизионности. Хроматографическая методика является специфичной, надежной, точной и достоверной для идентификации органических примесей и определения действующего вещества и может быть внедрена для оценки чистоты при получении ФАВ.

3. Разработана и валидирована методика определения содержания остаточных органических растворителей методом ГХ-ПИД. В работе выполнено сравнение трех подходов – сочетание парофазного анализа с разделением определяемых растворителей на стандартной колонке HP-5MS, введение в испаритель жидкой пробы с разделением на колонке, заполненной модифицированным поли(1-триметилсилил-1-пропин)ом, и прямой ввод пробы в испаритель и разделение на коммерческой капиллярной колонке DB-624. В результате проведенных экспериментов в соединении **1** найдены следовые содержания этилацетата 0.10 ± 0.09 ppm

и метил-*трет*-бутилового эфира 0.20 ± 0.06 ppm ($n=9$, $P=0.95$). Содержания *n*-гексана и дихлорметана находились ниже ПО.

4. Разработана методика определения элементных примесей методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой. Так как спектрометр рассчитан на работу с жидкими образцами, а фармацевтическое соединение представляет собой твердое вещество, нерастворимое в воде, были оптимизированы условия пробоподготовки в микроволновой системе автоклавного растворения. Подобраны инструментальные параметры работы на спектрометре модели 4100 с применением установки генерации гидридных форм для определения As и Hg, без установки – для определения остальных элементных примесей. Содержания V, Co, As, Mo, Ru, Pd, Ag, Cd, Pt и Hg находились ниже экспериментально установленных пределов обнаружения. Найденны содержания Al $(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-4}\%$, Fe $(4.3 \pm 0.9) \times 10^{-4}\%$, Cu $(0.8 \pm 0.6) \times 10^{-4}\%$, Pb $(5.8 \pm 1.5) \times 10^{-5}\%$ с применением метода «введено-найденно» и Al $(1.6 \pm 0.5) \times 10^{-4}\%$, Fe $(3.9 \pm 0.5) \times 10^{-4}\%$, Ni $(3.2 \pm 0.7) \times 10^{-5}\%$, Pb $(2.6 \pm 0.9) \times 10^{-5}\%$ с применением метода «введено-найденно» в сочетании с методом внутреннего стандарта.

5. Разработаны и валидированы методики определения исследуемого соединения в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС. Средние значения извлечения соединения методом экстракции сухого пятна плазмы крови и цельной крови составили 27 и 25%, соответственно. Средние значения извлечения соединения из плазмы крови и цельной крови с применением метода экстракции на модифицированном целлюлозном носителе были выше и составили 38 и 31%, соответственно. Все четыре методики могут быть применены для определения физиологически активного соединения в биологических средах и построения фармакокинетического профиля.

6. На основе полученных данных о физико-химических свойствах и чистоте анализируемого соединения разработан стандартный образец предприятия, который может быть в дальнейшем использован для определения действующего вещества и примесей разных классов в фармацевтическом соединении анальгетического действия.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Lastovka A.V., Fadeeva V.P., Bazhenov M.A., Tikhova V.D. Rapid Determination of Tellurium in Tellurium-Containing Organic Compounds by Microwave Plasma – Atomic Emission Spectrometry // Orient. J. Chem. – 2017. – V. 33. – N. 6. – P. 2796-2802.

2. Ластовка А.В., Фадеева В.П., Ильина И.В., Курбакова С.Ю., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Исследование физико-химических свойств и разработка методики количественного определения (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола, обладающего высокой анальгетической активностью // Зав. лаб. Диагностика материалов. – 2017. – Т. 83. – № 10. С. 11-17.

3. Ластовка А.В., Яковлева Е.Ю., Коллегов В.Ф., Фадеева В.П., Салахутдинов Н.Ф. Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии в субстанции

(2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ол, обладающей анальгетической активностью // Зав. лаб. Диагностика материалов. – 2018. – Т. 84. – № 9. С. 13-20.

4. Lastovka A.V., Rogachev A.D., Il'ina I.V., Kabir A., Volcho K.P., Fadeeva V.P., Pokrovsky A.G., Furton K.G., Salakhutdinov N.F. Comparison of dried matrix spots and fabric phase sorptive extraction methods for quantitation of highly potent analgesic activity agent (2R,4aR,7R,8aR)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2H-chromen-4-ol in rat whole blood and plasma using LC–MS/MS // J. Chromatogr. B – 2019. – V. 1132. – P. 121813.

5. Ластовка А.В., Фадеева В.П., Тихова В.Д. Определение теллура в теллуросодержащих органических соединениях методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой // Материалы II Всероссийской конференции «Аналитическая Спектроскопия» с международным участием. 27 сентября – 3 октября 2015 г. – Туапсе, 2015. С. 59.

6. Тихова В.Д., Фадеева В.П., Ластовка А.В., Баженов М.А., Бурнашова М.С. Использование атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой в элементном анализе органических синтетических и природных соединений // Материалы II Всероссийской конференции «Аналитическая Спектроскопия» с международным участием. 27 сентября – 3 октября 2015 г. – Туапсе, 2015. С. 81.

7. Ластовка А.В., Фадеева В.П., Салахутдинов Н.Ф. Определение (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола, обладающего высокой анальгетической активностью, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием «Аналитика Сибири и Дальнего Востока». 12-17 сентября 2016 г. – Барнаул, 2016. С. 194.

8. Ластовка А.В., Фадеева В.П., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Разработка и валидация методики количественного определения примесей методом ВЭЖХ (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола, обладающего высокой анальгетической активностью // Материалы III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием. 21-27 мая 2017 г. – Туапсе, 2017. С. 89.

9. Ластовка А.В., Фадеева В.П., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Разработка и валидация методики количественного определения примесей методом ВЭЖХ в субстанции дитиохромена, обладающего высокой анальгетической активностью // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии». 5-9 июня 2017 г. – Новосибирск, 2017. С. 215.

10. Фадеева В.П., Тихова В.Д., Никуличева О.Н., Дерябина Ю.М., Баженов М.А., Ластовка А.В. Анализ элементоорганических соединений - от гравиметрии до атомно-эмиссионной спектроскопии // Материалы Третьего съезда аналитиков России. 8-13 октября 2017 г. – Москва, 2017. С. 398.

11. Ластовка А.В., Коллегов В.Ф., Яковлева Е.Ю., Фадеева В.П., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Способ количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола (Дименола) // Материалы Третьего съезда аналитиков России. 8-13 октября 2017 г. – Москва, 2017. С. 361.

12. Ластовка А.В., Фадеева В.П., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Исследование чистоты фармацевтической субстанции (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола, обладающей анальгетической активностью // Материалы Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» с международным участием. 9-16 марта 2018 г. – Шереш, 2018. С. 64.

13. Ластовка А.В., Фадеева В.П., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Исследование новой субстанции (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола, обладающей анальгетической активностью, комплексом аналитических методов // Материалы VI Международной научной конференции «New functional materials and high technology». 17-21 сентября 2018 г. – Тиват, 2018. С. 51.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю – д.х.н. Фадеевой Валентине Павловне за помощь и поддержку при выполнении и написании моей диссертационной работы; чл.-к. РАН Салахутдинову Нариману Фаридовичу за постоянную помощь и консультации в области работы с физиологически активными соединениями; д.х.н. Волчо К.П. за ценные замечания и научные консультации; к.х.н. Ильиной И.В. и ведущему инженеру Курбаковой С.Ю. за предоставленные для анализа образцы; к.х.н. Рогачеву А.Д. за совместную работу и консультации при разработке биоаналитических методик определения исследуемого соединения в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС; к.х.н. Яковлевой Е.Ю. и ведущему инженеру Коллегову В.Ф. за обучение основам газовой хроматографии и обсуждение полученных результатов.

Автор также благодарен сотрудникам Международного университета Флориды, США, Ph.D., prof. Kabir A., Ph.D., prof. Furton K.G. за предоставленные модифицированные целлюлозные экстракционные материалы для пробоподготовки при определении анализируемого соединения в биологических матрицах и обсуждение полученных экспериментальных результатов.

Выражаю благодарность также сотрудникам Химического сервисного центра коллективного пользования НИОХ СО РАН за измерения физико-химических характеристик исследуемого вещества, за проведение РСА и получение спектров ЯМР. А также благодарность заведующей и всем сотрудникам лаборатории микроанализа НИОХ СО РАН за доброжелательное отношение и поддержку.

Цитируемая литература:

[1] Пат. 2555361 Российская Федерация, МПК51 А61К 31/381, А61К 31/353, А61Р 29/00. Производные 2Н-хромена в качестве анальгезирующих средств / Хайд Е.В., Павлова А.В., Михальченко О.С., Корчагина Д.В., Толстикова Т.Г., Волчо К.П., Хазанов В.А, Салахутдинов Н.Ф.; патентообладатель ФГБУН НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ООО «Леофорс». – опубл. 10.07.15, Бюл. № 19. – 8с.

[2] Nazimova E., Pavlova A., Mikhailchenko O., P'ina I., Korchagina D., Tolstikova T., Volcho K., Salakhutdinov N. Discovery of highly potent analgesic activity of isopulegol-derived (2R,4aR,7R,8aR)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2H-chromen-4-ol // Med. Chem. Res. – 2016. – V. 25. – N. 7. – P. 1369-1383.

ЛАСТОВКА Анастасия Валерьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ,
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК
КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДНОГО (-)-ИЗОПУЛЕГОЛА – СОЕДИНЕНИЯ
С ВЫСОКОЙ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Подписано в печать 24.01.2020г. Печать офсетная.

Бумага офсетная. Формат 60×84 1/16. Усл. печ. 1,32 л.

Тираж 120 экз.

Отпечатано в типографии «АЛЕКСПРЕСС» ИП Малыгина А.Н.
630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 6/1, оф. 104

Тел. (383)217-43-46, 8-913-922-19-07

E-mail: copy@alexpress.ru